云 南 植 物 研 究 1988;10(2):245—248
Acta Botanica Yunnanica

香石竹原生质体再生的研究

邹吉涛 钱迎倩

(中国科学院植物研究所，北京)

关键词 香石竹；原生质体培养

香石竹（*Dianthus caryophyllus* L.）是一种受到世界性欢迎的观赏植物。香石竹的快速繁殖已有不少研究报告[1－3]。为了寻找新颖的育种手段，培育新的品种，我们进行了该植物的原生质体培养。米益（Mii，et al.，1682）已对香石竹的原生质体培养作过报道[4]，但他们所用的材料为叶肉原生质体。为期望得到更多变异的再生植株，我们选用愈伤组织做为游离原生质体的材料。

材 料 和 方 法

用试管中生长良好的小苗作为材料。在无菌条件下把小苗的叶片切成两半，接种到附加有2mg/l 2,4-D的DPD培养基上[5]。两星期后，在切口处出现愈伤组织。在同样培养基上转移一次后，将愈伤组织继代到附加有1mg/l 2,4-D的B_5培养基[6]上。在此培养基上愈伤组织生长很快。继代4—5次后，获得大量的愈伤组织。取用愈伤组织上体积小而致密的表层细胞作为游离原生质体的材料。

游离原生质体所用的酶混合液组成如下：1%纤维素酶（Onozuka R-10，Kinki Yakult，Nishinomiya，Japan），0.3%果胶酶（Macerozyme R-10，Kinki Yakult，Nishinomiya，Japan），0.5%崩溃酶（Driselase，Kyowa Hakko Kogya，Tokyo，Japan），0.1%牛血清清蛋白，3%葡聚糖硫酸钾，具13%（W/V）甘露醇的CPW[7]盐溶液，pH 5.7。25℃黑暗下处理8小时，在处理的最后2小时放到60转/分的转床上旋转振荡。

材料与酶液用300目不锈钢网过滤，以除去未被酶解的大块组织。且原生质体的滤液经100×g条件下离心5分钟。收集的原生质体用由900 mg/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$，200 mg/l KH_2PO_4及13%（W/V）甘露醇组成的洗液洗涤2次，第三次用原生质体培养基（表1）进行洗涤。以1—3×10^4/ml的密度在直径为30mm培养皿中培养。

进行了B_5，MS[8]及KM8p[9]等不同基本培养基的比较实验。渗透稳定剂均用60 g/l 甘露醇及30g/l 蔗糖。原生质体培养的最初几日放在半透明的塑料盒中，27℃散

1987-01-21收稿

表 1　香石竹原生质体培养基

Table 1　Medium of protoplast of *Dianthus caryophyllus* L.

基本培养基B_5及如下附加物(mg/l, pH 5.7)

甘氨酸	2	叶酸	0.4	生物素	0.05	椰乳	100 ml/l
L-谷氨酸	100	L-天冬氨酸	100	2,4-D	1	甘露醇	60 g/l
水解酪蛋白	100	NAA	0.1	6-BA	0.2	蔗糖	30 g/l

射光条件下。出现分裂后转入同样温度的 1000 lx 光照中，光照时间为 8 小时/天。第二次分裂后，加入不含甘露醇，其它成分相同的细胞培养基。以后加液时细胞培养基的量逐步增加。3 星期后培养物可过渡到在纯细胞培养基中培养。

结　果　和　讨　论

愈伤组织细胞的细胞壁成分比较复杂。在我们实验条件下，香石竹愈伤组织如仅采用常规所用的纤维酶及果胶酶，细胞壁不易降解。崩溃酶是必不可少的。崩溃酶是一种降解壁活性强但具多种对原生质体有不利影响（如蛋白酶，脂酶及核酸酶等）的杂酶。实验说明，在酶混合液中加入牛血清清蛋白及葡聚糖硫酸钾是必要的。如酶混合液中无这两种成分，原生质体在收集过程中破碎的数目明显增多，且培养过程中存活率极低。Lai 等[10]在水稻原生质体游离和培养研究中有说服力地指出，牛血清清蛋白不仅提高原生质体的生活力并能阻止细胞器在游离和培养过程中的损坏。葡聚糖硫酸钾可增强原生质体在酶液中的稳定性，也已为不少实验所证明[11, 12]。在实验中，由于这两种药品的添加从而得到大量生活的原生质体（图版 I， 1）。

香石竹愈伤组织游离得到的原生质体在体积上相差甚大。大原生质体细胞质稀薄，经培养后只见有出芽现象，很少见到分裂。而细胞质致密的小原生质体在24小时培养后，就能见到变形，再生了细胞壁，并能持续地分裂下去。

作了不同基本培养基对香石竹原生质体分裂影响的比较。在 MS 培养基上，附加了不同的激素配合，都只能有细胞壁的再生而未见到细胞分裂。在KM8p 培养基中原生质体再生壁后第一次分裂频率相当高，但绝大多数都不能持续分裂下去，偶而见到有二次分裂的现象。而在有一系列附加物的B_5培养基上（表 1），培养 3—4 天后观察到第一次分裂。第一次分裂多数是不均等分裂（图版 I， 2）。培养 8—10天后，出现第二次分裂，对香石竹原生质体来说，重要的是此时应开始加细胞培养基，以降低渗透压。细胞培养基添加量为原来原生质体培养基体积的 1／5 左右为宜。过量细胞培养基的加入，因渗透压突然过大的改变，细胞受不了这样的冲击而死亡。此后，细胞培养基的加入量可逐步增加。培养 3 周后可得到细胞团（图版 I， 3）。如在 3 周后仍不加新鲜培养基，细胞逐渐变长，衰老，以至死亡。一个月后可形成肉眼可见的愈伤组织（图版

I，4）。

分化植株的工作正在进行，但是较困难。

致谢　材料由本所王玉英同志提供。

参　考　文　献

1　张丕方，倪德祥，王凯基等．植物学通报　1985；6（5）：49—52

2　Awad A E, Boundok A, Emara H. Propagation of carnation through tissue culture, Abstract, VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. 1986; 238

3　Hackett W P, Anderson J M. *Proc Am Soc Hort Sci* 1967; 90; 365—369

4　Mii M, Cheng S-M. Proc 5th Int Cong Plant Tissue and Cell Cultures. Tokyo, IAPTC Maruzen Co, 1982; 585

5　Durand A, Potrykus I, Donn G. *Z. Pflanzenphysiol* 1973; 69; 26—34

6　Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. *Exp Cell Res* 1968; 50; 151—158

7　Frearson E M, Power J B, Cooking E C. *Dev Biol* 1973; 33; 130—137

8　Murashige T, Skoog F A. *Physiol Plant* 1962; 15; 473—497

9　Kao K N, Michayluk M R. *Planta* 1975; 126; 105—110

10　Lia L-L, Lin L-F. Proc 5th Int Cong Plant Tissue and Cell Cultures. Tokyo, IAPTC Maruzen Co, 1982; 603

11　Rao I V R, Mehta V, Ram H Y M. Proc 5th Int Cong Plant Tissue and Cell Cultures. Tokyo, IAPTC Maruzen Co, 1982; 595

12　Sink K C, Niedz R P. Proc 5th Int Cong Plant Tissue and Cell Cultures. Tokyo, IAPTC Maruzen Co, 1982; 583

本文图版见本刊10卷1期。

STUDIES ON PROTOPLAST REGENERATION OF DIANTHUS CARYOPHYLLUS

Zou Jitao, Qian Yingqian (Y. C. Chien)

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

Abstract Large amounts of viable protoplast were isolated from calli of *Dianthus caryophyllus* L. It is necessary that bovine serum albumin and potassium dextran sulfate were involved in enzyme mixtures for obtaining surviving and dividing protoplats. Comparative experiments were studied on different basic culture medium, such as B_5, MS and KM8p. Sustained division of carnation protoplast can be obtained only on B_5 medium supplemented with 2 mg/l glycine, 0.4 mg/ 1 folic acid, 0.05 mg/ 1 biotin, 100 mg/l L-glutamic acid, 100 mg/l L-aspartic acid, 100 mg/l casein hydrolysate. 1 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l NAA,0.5 mg/l 6-BA,100 ml/l coconut milk, 60 g/l mannitol and 30 g/l sucrose, pH 5.7. Calli can be seen with naked eye after one month in culturing. Differentiation of calli derived from protoplast is in progress, but it is difficult.

Key words Carnation; Protoplast culture

Plate I appeared in *Acta Botanica Yunnanica* 1988; 10 (1).